



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



# Evaluación de cepas de *Trichoderma* para el control del moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) variedad Cherry Oregon Hemp

Vargas Quito, Jeanneth Patricia

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

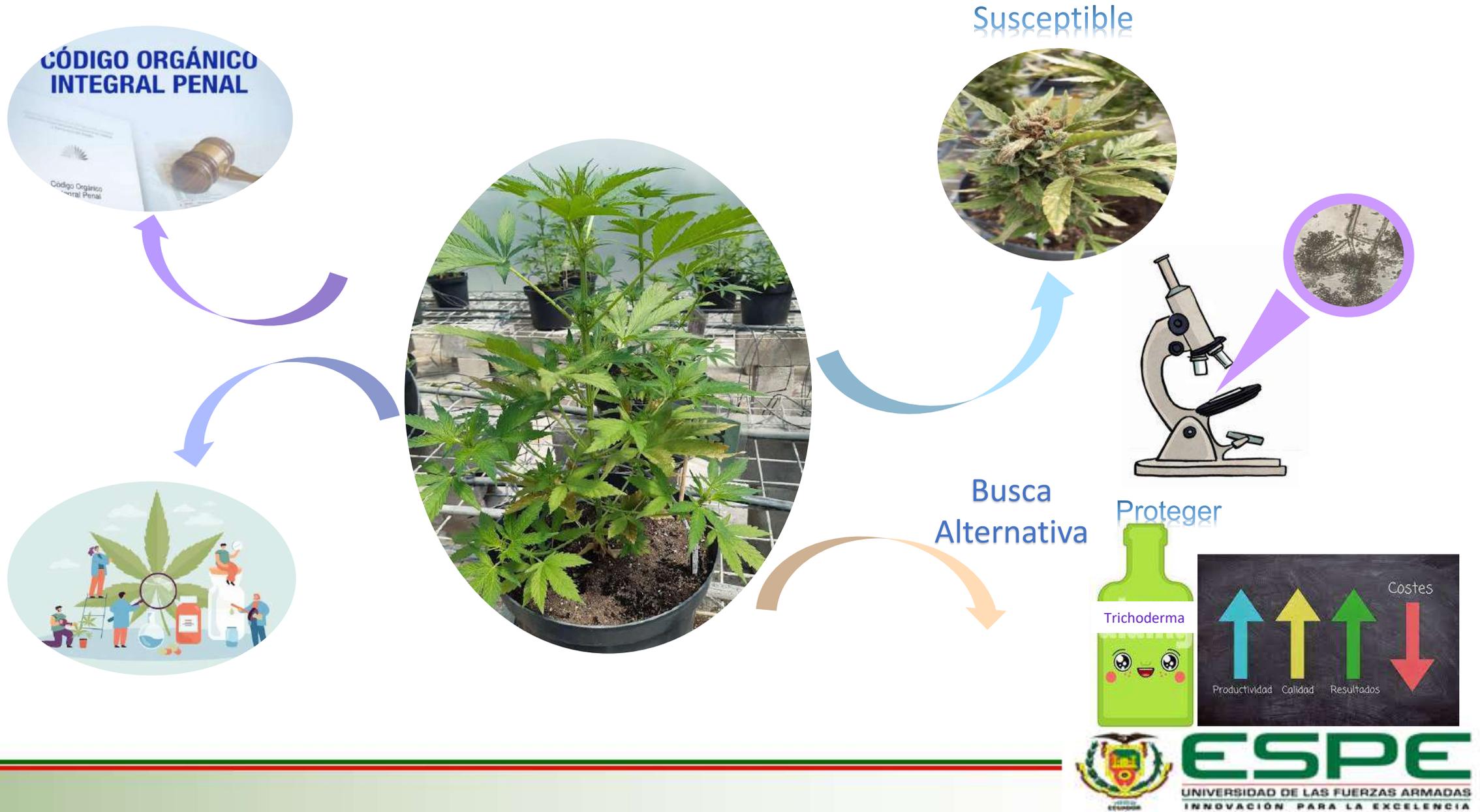
Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Landázuri Abarca, Pablo Aníbal, Mgtr.

02 de agosto del 2023



# Introducción



# Justificación



**Ecuador**

7 tipos de licencias para ejercer actividades con el Cannabis no Psicoactivo



En consecuencia



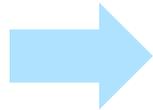
Ofrecer



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

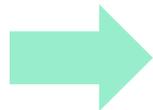
# Objetivos

## Objetivo general



- Evaluar cepas de *Trichoderma* para el control moho gris (*Botrytis cinerea*) en el cultivo del cáñamo (*Cannabis sativa* L.) variedad Cherry Oregon Hemp.

## Objetivos específicos

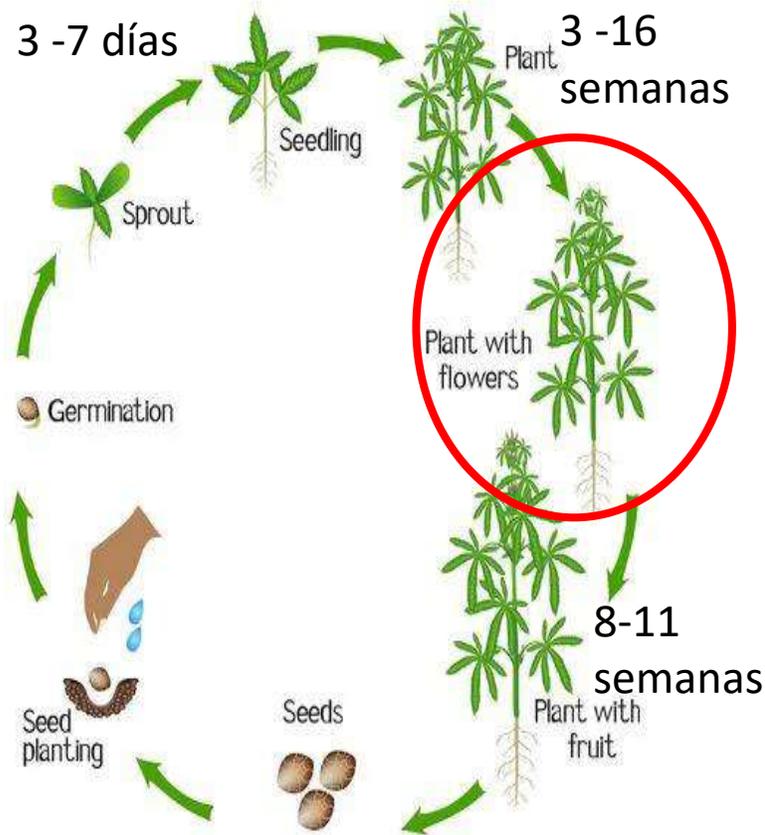


- Evaluar mediante pruebas de antagonismo *in vitro*, empleando seis cepas de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *Botrytis cinerea*.
- Evaluar bajo invernadero el potencial de las tres cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo de *B. cinerea* en el cultivo de cáñamo, variedad Cherry Oregon Hemp.

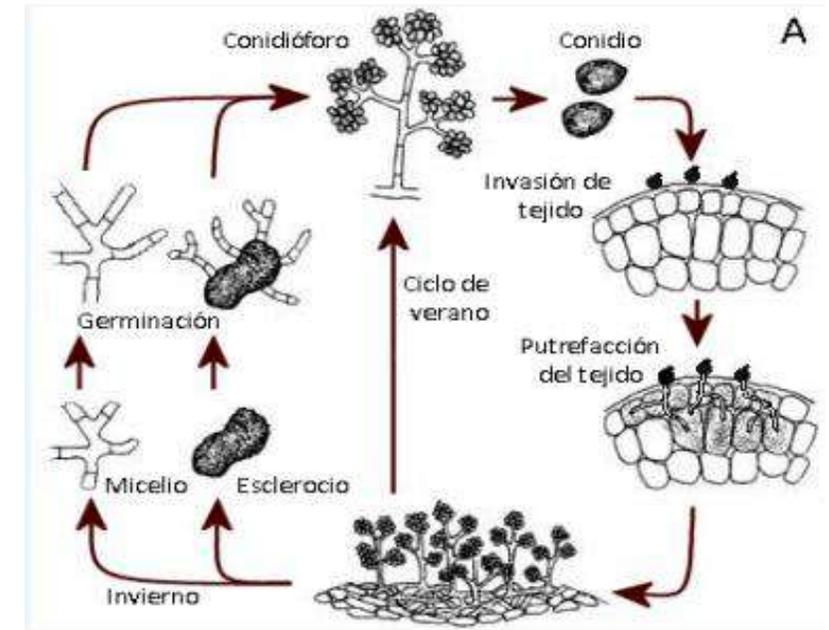


# Marco Referencial

## Cáñamo



## Botrytis cinerea

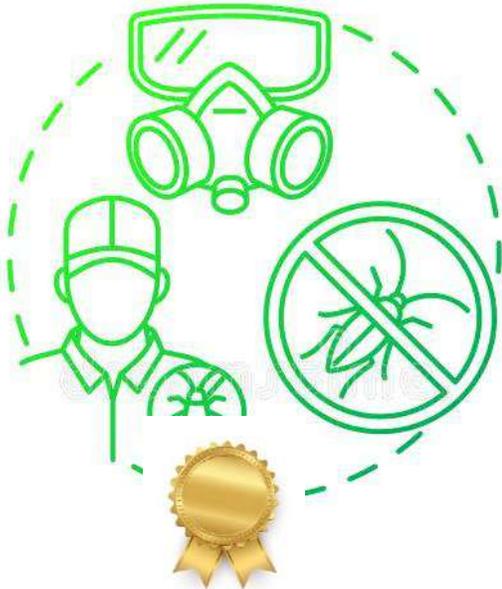


Familia cannabáceas, **Género** *cannabis*, **Especie** *Cannabis sativa*  
Carlos Linneo 1753.

(Thomas & ElSohly, 2016), (Lumbreras, 2017)

# Marco Referencial

## Control Biológico



- Efectivo, rentable
- Recomendado a largo plazo

Agente de control

Respuesta Inmunitaria

Crecimiento de las plantas

Reparación de suelos

Resistencia a sequias

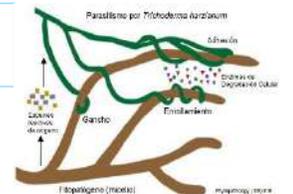
***Trichoderma***

## Mecanismos de acción

Competencia

Antibiosis

Mico parasitismo

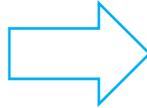


**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# Metodología

## Primera etapa

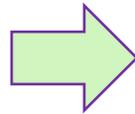
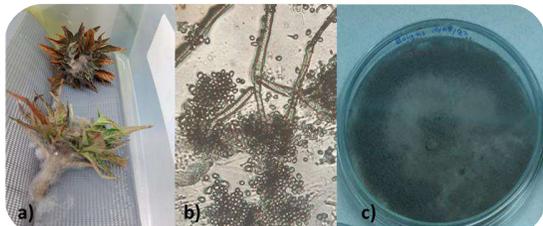
Ubicación del área de investigación



Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, en el laboratorio de Control Biológico del Departamento de Protección Vegetal

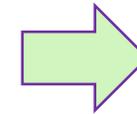
Aislamiento de *B. cinerea*

- 8 días presentar la esporulación.
- Incubación a 18°C por 5 días



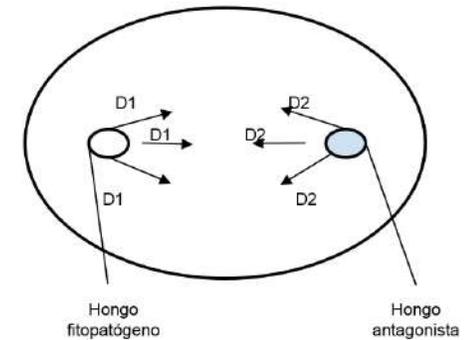
Multiplicación de *Trichoderma* spp.

- Medio PDA
- Incubación a 25°C



Pruebas de confrontación dual

- Inoculación disco 5 mm, distancia 2cm
- Testigos



## Distribución de los tratamientos

Tratamiento	Cepa	Código
1	Cepa 1 <i>Trichoderma</i> spp.	C1
2	Cepa 2 <i>Trichoderma</i> spp.	C2
3	Cepa 3 <i>Trichoderma</i> spp.	C3
4	Cepa 4 <i>Trichoderma</i> spp.	C4
5	Cepa 5 <i>Trichoderma</i> spp.	C5
6	Cepa 6 <i>Trichoderma virens</i>	C6

## Análisis estadístico

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- $Y_{ij}$  = efecto de la cepa antagonista
- $\mu$  = media general
- $T_i$  = efecto de la i-enésima cepa de *Trichoderma*
- $\varepsilon_{ij}$  = error experimental



# Metodología

## VARIABLES A EVALUAR

### Porcentaje de inhibición



Se aplicando la fórmula de Fokkema (1973)

$$\% I = \frac{D1 - D2}{D1} * 100$$

**%I**= porcentaje de inhibición del crecimiento micelial  
**D1**= diámetro del crecimiento micelial del testigo (mm)  
**Di**= diámetro del crecimiento micelial del influenciado (mm)

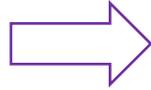
## ESCALA DE ANTAGONISMOS PROPUESTA POR BELL ET AL. (1982)

Clase	Características
I	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., que cubrió toda la superficie del medio y redujo el crecimiento del patógeno.
II	Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., que cubrió al menos 2/3 partes del medio.
III	<i>Trichoderma</i> spp., y fitopatógenos crecieron 1/2 y 1/2 la superficie del medio, uno no se sobrepuso al otro.
IV	Hongo patógeno creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de <i>Trichoderma</i> spp.
V	Crecimiento del patógeno que cubrió toda la superficie del medio.

# Metodología

## Segunda etapa

Ubicación del área de investigación



Invernadero automatizado INIAP – Sangolquí

Trasplante de las plántulas de cáñamo

- Sustrato turba, pomina y humus.
- Trasplante a los 30 días después de la germinación



Multiplicación masiva en sustrato de arroz

- 1 cm<sup>2</sup> aprox. del agar colonizado con el hongo seleccionado.
- Incubación 24°C, durante 6 días.



Aplicación del inóculo de *B. cinerea* en las plantas

- Reactivación *B. cinerea*.
- Concentración de 1x10<sup>5</sup> conidios ml<sup>-1</sup>

Aplicación de los tratamientos

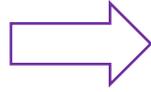
- Lavado del sustrato de arroz.
- Concentración de 1x10<sup>6</sup> conidios ml<sup>-1</sup>



# Metodología

## Segunda etapa

Ubicación del área de investigación



Invernadero automatizado INIAP, Hacienda el Prado, Sangolquí

### Distribución de los tratamientos en la etapa de campo

Tratamiento	Cepa	Código
1	Cepa 1 <i>Trichoderma</i> spp.	T1
2	Cepa 6 <i>Trichoderma virens</i>	T2
3	Cepa 3 <i>Trichoderma</i> spp.	T3
4	Testigo enfermo sin control	T4

### Análisis estadístico:

Dispuestos DCA cuyo modelo matemático es el siguiente:

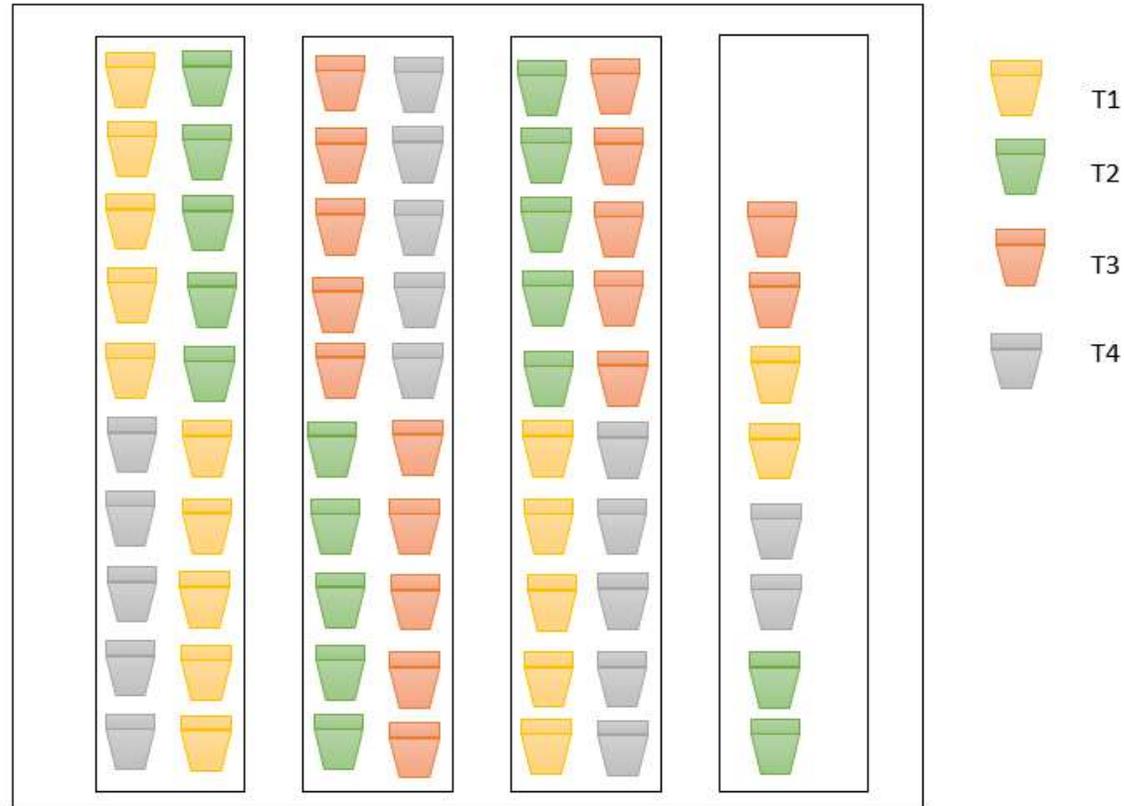
$$Y_{ij} = \mu + A_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- $Y_{ij}$  = efecto del biocontrolador
- $\mu$  = media general
- $T_i$  = efecto de la  $i$ -enésima cepa de biocontrolador
- $\varepsilon_{ij}$  = error experimental



# Croquis experimental



Nota. T1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.); T2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*); T3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.); T4 (Testigo enfermo con *Botrytis cinerea*)

# Metodología

## Variables agronómicas

Altura



Peso seco de la raíz



Peso seco de las inflorescencias (cogollos)



# Metodología

## Variables a evaluar

### Incidencia

$$\text{Indicencia (\%)} = \frac{\text{Nro de plantas u \u00f3rganos afectados}}{\text{Nro total de plantas analizadas}} \times 100$$

### Severidad

$$\text{Severidad} = \left( \frac{\text{\u00c1rea afectada}}{\text{\u00c1rea total}} \right) \times 100$$



### Escala de severidad

Grado 0	Sin evidencia sintomatol\u00f3gica de <i>B. cinerea</i>
Grado 1	Aparici\u00f3n de sintomatolog\u00eda de <i>B. cinerea</i> afectando al menos de c\u00e1liz floral.
Grado 2	Presencia de s\u00edntomas de <i>Botrytis cinerea</i> mayor 1% - menor o igual 5% del cogollo.
Grado 3	Presencia de s\u00edntomas de <i>Botrytis cinerea</i> mayor 5% y menor a 20% del cogollo
Grado 4	Presencia de s\u00edntomas de <i>Botrytis cinerea</i> mayor o igual al 20% del cogollo

# Resultados y Discusión

## Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* spp., para el control in vitro de *B. cinerea*.

Tratamientos	gl	% de inhibición	F	p-valor
Cepa 2 <i>Trichoderma</i> spp. (T2)	1	11,90 ± 2,17 c	37,94	<0,0001
Cepa 4 <i>Trichoderma</i> spp. (T4)	1	18,86 ± 2,83 b		
Cepa 5 <i>Trichoderma</i> spp. (T5)	1	18,23 ± 3,28 b		
Cepa 6 <i>Trichoderma virens</i> (T6)	1	21,52 ± 3,63 b		
Cepa 3 <i>Trichoderma</i> spp. (T3)	1	26,08 ± 2,00 a		
Cepa 1 <i>Trichoderma</i> spp. (T1)	1	27,97 ± 3,60 a		

Acosta et al., (2021) realizaron pruebas duales con cepas nativas *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. donde indica que una cepa presentó un menor grado de inhibición como fue el caso de *T. harzianum* (MCHT07) con 6.81 % inferior al resto.



Prueba de antagonismo

# Resultados y Discusión

## Variables agronómicas

*Variables agronómicas con el uso de cepas de Trichoderma spp., para el cultivo de cáñamo*

Fuentes de variación	Altura	Diámetro del tallo
P-valor	*	-
F	3,87	2,25
T1	63,75 ± 7,26 ab	0,79 ± 0,08 a
T2	67,36 ± 11,13 a	0,86 ± 0,13 a
T3	58,39 ± 9,52 ab	0,84 ± 0,08 a
T4	54,64 ± 13,86 b	0,78 ± 0,09 a

**Nota:** Tratamiento 1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.);  
Tratamiento 2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*);  
Tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.);  
Tratamiento 4 (Testigo sin control). Los valores en la columna seguidos por una letra presentan diferencias significativa (P<0,05)

(Candelero et al., 2015) Estudio diferentes especies de *Trichoderma* como promotoras de crecimiento en plántulas de ají, en la que usan *Trichoderma virens* y obtuvieron promedios mayores en el crecimiento

(Hoyos-Carvajal et al., 2009) Crecimiento y estimulación en frijol con *Trichoderma* donde evaluó 101 cepas, mostro puede producir efectos positivos, nulos o incluso negativos, con lo que concuerda con el tratamiento 3



# Resultados y Discusión

Fuentes de variación	Biomasa radicular			Rendimiento
	Peso fresco	Peso seco	%Materia seca	
P-valor	*	*	*	*
F	6,52	10,42	9,01	6,59
T1	34 ± 23,51 a	14,60 ± 9,95 a	44,18 ± 9,21 b	55,06 ± 4,77 a
T2	31 ± 10,3 ab	18,84 ± 8,16 a	59,26 ± 11,74 a	55,04 ± 11,18 a
T3	14,43 ± 7,87 c	5,89 ± 2,80 b	42,85 ± 10,77 b	50,52 ± 7,36 a
T4	17,41 ± 9,54 bc	7,43 ± 5,11 b	41,34 ± 9,57 b	37,1 ± 17,99 b

**Nota:** Tratamiento 1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*); Tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 4 (Testigo sin control). Los valores en la columna seguidos por una letra presentan diferencias significativa (P<0,05)

(Contreras-Cornejo et al., 2009), muestran que la cepa de *Trichoderma virens* presentan características fenotípicas relacionadas con las auxinas ayudan a la producción de biomasa y a un desarrollo de las raíces laterales

(Kakabouki et al., 2021), en su estudio sobre la colonización de *Trichoderma harzianum* sobre el desarrollo, crecimiento y el contenido de CBD del cáñamo (*Cannabis sativa* L.), en la cual nos presenta que no hubo diferencias significativas en el rendimiento aplicando pero entre variedades existió diferencias.



# Resultados y Discusión

## Incidencia y severidad

Porcentaje de incidencia y severidad de *B. cinerea* evaluada entre tratamientos

Fuentes de variación	Incidencia	Severidad
P-valor	*	*
F	13,64	5,55
T1 (Aislado 1 <i>Trichoderma</i> spp.)	1,11 ± 1,14 b	3,21 ± 5,04 b
T2 (Cepa <i>Trichoderma virens</i> )	1,12 ± 1,19 b	7,12 ± 7,39 ab
T3 (Aislado 3 <i>Trichoderma</i> spp.)	0,51 ± 0,91 b	1,37 ± 2,90 b
T4 (Testigo sin control)	3,74 ± 2,37 a	9,49 ± 7,63 a

Nota. Letras distintas indican diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

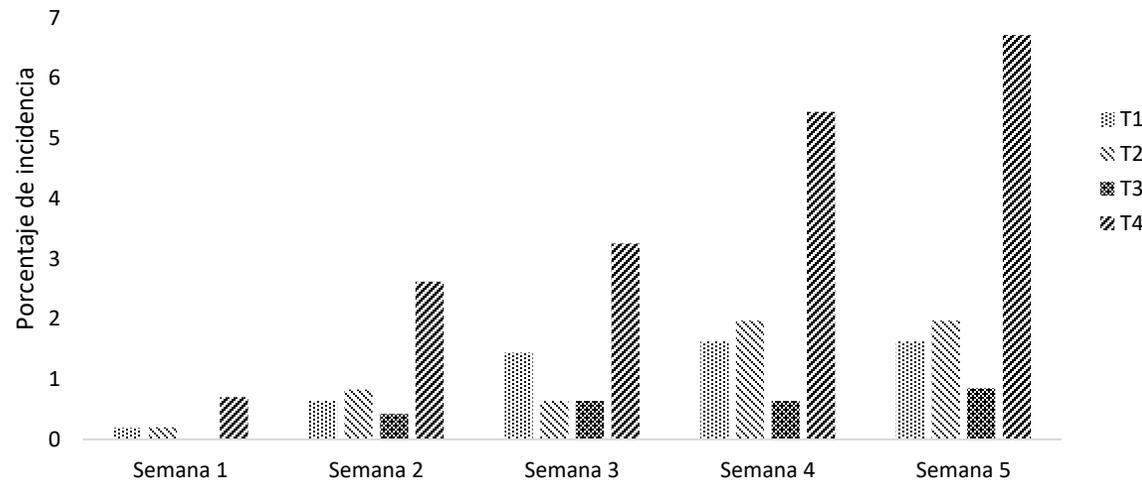
Silva & Sandoval, (2004), menciona que utilizaron diferentes tipos de cepas *Trichoderma* spp. para controlar a *B. cinerea* en *Leucadendron*, algunas de las cepas no presentaron ser un buen biocontrolador sin embargo, cuando usaron la cepa de *Trichoderma virens* presentaron un menor control

Los tratamientos presentaron un control de la enfermedad similar en la incidencia, sin embargo T3 presentó menor severidad con respecto a los demás tratamientos

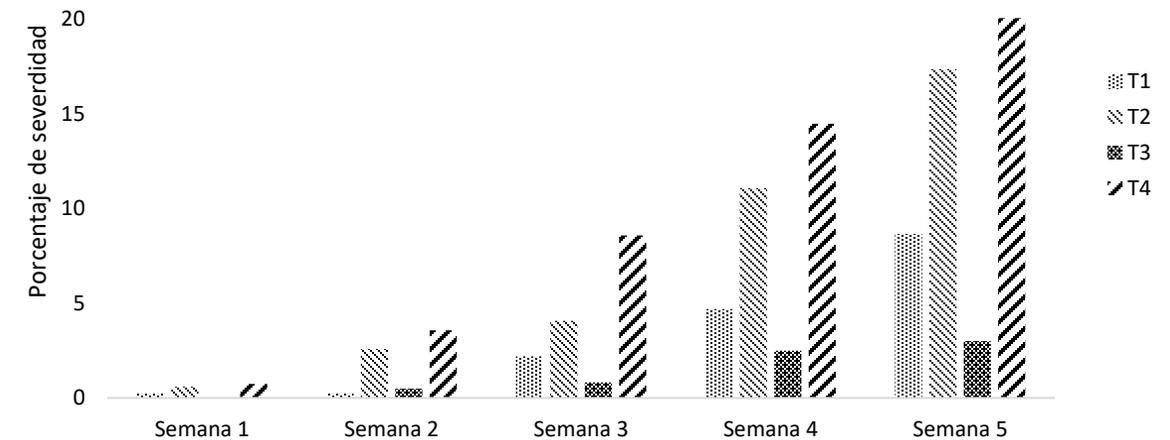


# Resultados y Discusión

Porcentaje de incidencia de *B. cinerea* por efecto del uso de cepas de *Trichoderma* evaluada entre tratamientos por semana



Porcentaje de severidad de *B. cinerea* por efecto del uso de cepas de *Trichoderma* evaluada entre tratamientos por semana

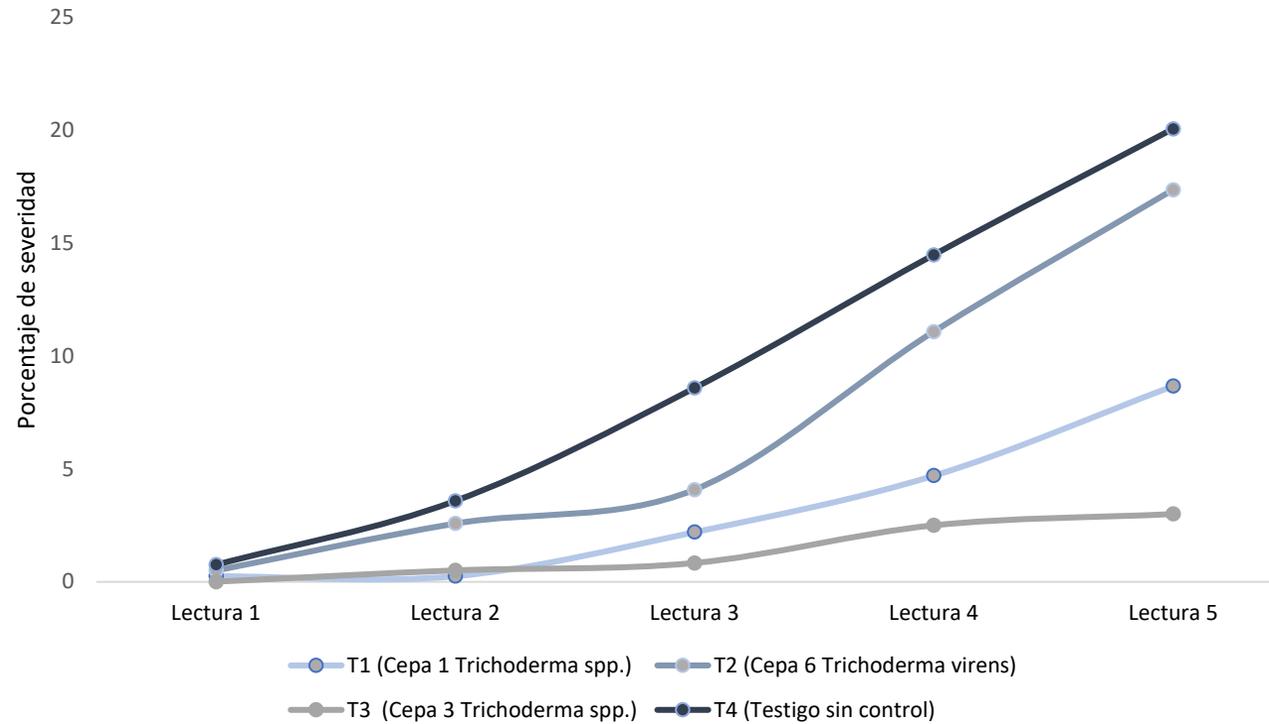


Nota. Tratamiento 1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*); Tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 4 (Testigo sin control).

(O'Neill et al., 1996). Asimismo en otro estudio indicaron que al emplear cepas de *Trichoderma harzianum* y *lignorum* en fresa tuvieron una incidencia menor sobre *B. cinerea* en comparación con el tratamiento químico.

# Resultados y Discusión

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) por efecto de las cepas *Trichoderma* en los tratamientos



Nota. Tratamiento 1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*); Tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.); Tratamiento 4 (Testigo sin control).



# Conclusiones

- Al evaluar las cepas de *Trichoderma* mostraron un efecto antagónico sobre *B. cinerea*, destacando las cepas C1, C3 quienes registraron un índice de antagonismo tipo 1 cubriendo toda la superficie del medio y reduciendo el crecimiento del patógeno, mientras que para las cepas C4, 5, 6 presentaron un índice de antagonismo tipo 2 cubriendo 2/3 del medio y finalmente con menos efecto fue la cepa C2 que creció la mitad de la superficie sin sobreponerse al patógeno.
- De las cepas seleccionadas la incidencia y severidad de *B. cinerea* en cañamo se encontró una disminución con respecto al testigo, en el grado de incidencia no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados con *Trichoderma* spp. Sin embargo, con respecto a la severidad se destacó el tratamiento T3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.), presentando un grado 2 con una disminución de síntomas de *Botrytis cinerea* entre 1 al 5% en el cogollo



# Conclusiones

- Las plantas de cáñamo aplicadas, con los tratamientos de *Trichoderma* no presentaron diferencias significativas con respecto al rendimiento sin embargo, los tratamientos 1, 2 alcanzaron los mejores promedios de peso de cogollos.
- El tratamiento T2 (Cepa 6 *Trichoderma virens*), presentó una mayor altura, así como también en el peso fresco, peso seco y porcentaje de materia seca de raíz que los tratamientos T1 (Cepa 1 *Trichoderma* spp.) y T3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.).

# Recomendaciones

- Se recomienda para el control de *Botrytis cinerea* en cáñamo el tratamiento 3 (Cepa 3 *Trichoderma* spp.) ya que disminuyó la incidencia y severidad de la pudrición del cogollo.
- Se recomienda realizar otro tipo propagación para *Trichoderma*, las cuales cumplan con los requerimientos nutricionales para su crecimiento y desarrollo.
- Se recomienda evaluar el uso del tratamiento 3 (Cepa 3 de *Trichoderma* spp.) con diferentes concentraciones, durante las etapas de prefloración y floración.
- Se recomienda realizar una combinación de los tratamientos 3, 2 debido a que el tratamiento 3 mostró gran capacidad para control de *Botrytis cinerea* y el tratamiento 2 mejoró las características agronómicas de la planta de cáñamo.

# Agradecimientos



**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Ing. Pablo Landázuri  
Ing. Cristina Tello  
Ing. Jorge Merino  
Ing. Pablo Jaramillo  
Ing. Juan Tigrero  
Doc. Patricio Pérez  
Doc. César Falconí



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA